技術情報

マアジ及びニシマアジの
魚種判別マニュアル

平成 19 年 11 月 19 日



独立行政法人　農林水産消費安全技術センター



独立行政法人　水産総合研究センター

目次

i)　はじめに

本マニュアルは、農林水産技術会議委託プロジェクト研究「近縁魚類等の種判別技術および漁獲地域判別技術の開発（平成14～16年度実施）」における独立行政法人水産総合研究センターの成果を基に、独立行政法人農林水産消費安全技術センターと独立行政法人水産総合研究センターが共同で、マアジ属魚類の加工食品に関する表示が正しく行われているかどうかを推定するための検査法としてまとめたものである。

水産物の生鮮食品は、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律」（昭和 25 年法律第 175 号）の生鮮食品品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 514 号）及び水産物品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 516 号）に基づき、平成 12 年 7 月 1 日から品質表示の義務化が行われており、表示に当たっては、販売者等が「名称」、「原産地」、「冷凍したものを解凍したものである場合にはその旨」及び「養殖されたものである場合にはその旨」を記載する事とされている。また、加工食品は、加工食品品質表示基準(平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示 514 号)に基づき、品質表示の義務化がおこなわれており、表示に当たっては製造業者等が「名称」「原材料名」「内容量」「賞味期限」「保存方法」「製造業者等の氏名又は名称及び住所」及び輸入品にあっては「原産国」を記載する事とされている。さらに、平成 16 年 9 月の加工食品品質表示基準の改正により、同基準の別表２(参考資料別表１参照)に掲げる加工食品は、主な原材料（原材料に占める重量の割合が最も多く、かつ当該割合が 50　%以上のもの）の原産地名の表示が義務づけられており、製造業者等が原則として国産品にあっては国産である旨を、輸入品にあっては原産国名を記載することとされている。

現在、日本近海で生息するマアジ属魚類はマアジ(*Trachurus　japonicus*)のみであり、また、輸入されるアジ類の 7 割がヨーロッパ諸国から輸入されるニシマアジ(*T.　trachurus*)が占める（別表２）。マアジとニシマアジを形態的に比較すると、ニシマアジはマアジに比べて頭部が大きく、体高が低いなどの特徴があるが、非常に類似しているため外観での判別は難しい（別図１）。よって、科学的な分析が必要となるが、本マニュアルに記載したミトコンドリア DNA の魚種特異的な配列を分析することにより、マアジ及びニシマアジを DNA レベルで特定し、原料原産地に関する表示の真正性を推定することが可能となる。

なお、マアジ属とムロアジ属は稜鱗（ゼイゴ：縦長の堅い鱗）を比較することで外観上判別可能である。具体的には、マアジ属の稜鱗は尾部から頭部にかけて側線を覆うのに対し、ムロアジ属の稜鱗は部分的であり、第一背鰭前方にはない（別図２）。

ii)　検査における一般事項

PCR では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので目的外の DNA（特に PCR 産物）の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面等から分泌されている DNase の混入を防止しなければならない。「JAS 分析試験ハンドブック　遺伝子組換え食品・検査分析マニュアル　コンタミネーション防止編」を参照し、適切な措置を講じる。特に必要な配慮を、次に示す。

（１）溶液類は、熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。純水は、電気伝導率 0.0056 mS/m (25 ℃)以下になるように脱イオン化されたものを用い、滅菌水は、純水を 121 ℃、15 分以上オートクレーブで処理したものを用いる。

（２）チップやチューブ類は必ず使い捨てとし、洗ったものを再使用しない。

（３）マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 mL と 0.2 mL 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌をし、その後、乾燥器に入れ完全に乾かしてから用いる。あるいは、可能なものについては乾熱滅菌を行う。

（４）DNA を操作するときは、必要に応じてクリーンベンチを使用するとともに、実験台上をエタノールで消毒し、必ずゴム手袋をはめ、作業中も頻繁にエタノールで消毒すること。ゴム手袋はパウ

ダーなしのものを用いるか、パウダーを洗い落としてから使用する。
（５）滅菌水や TE 緩衝液に DNase が混入すると被害が広がるので、この２つの溶液は実験者ごとに別々に作製し、頻繁に（少なくとも月に一回程度）作り直す。

iii)　試薬の管理

遺伝子関連の実験では、強力な変異原性物質等を用いる場合もあるので、試薬や廃液の管理をしっかり行う必要がある。「試薬管理マニュアル」及び「JAS 分析試験ハンドブック　遺伝子組換え食品・検査分析マニュアル　試薬調製編」を参照し適切な管理を行うこと。

iv）　安全性に関する情報

※エチジウムブロミドについて

ゲル電気泳動に使用する。2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な変異原性がある。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。廃液は、エチジウムブロミド処理用の器具が市販されているので、それを利用する。高濃度の場合は、処理に出すこと。

※トランスイルミネータについて

紫外線を発生し、特に目に対して有害である。照射時間を最小にし、防護眼鏡又は同等品を着用すること。

１　判別の概要

まず、試料（アジ）からシリカスピンカラムを使用した方法により DNA 溶液を抽出する。すなわち、試料を Proteinase K を含んだ抽出緩衝液中で溶解し、RNase A 処理を行う。その後、DNA を高塩濃度緩衝液中でシリカゲルに吸着させ、洗浄後，低濃度緩衝液を用いて溶出する。抽出した DNA 溶液を鋳型として、マアジ属のミトコンドリア DNA の NADH dehydrogenase subunits 5（ND5）に特異的なプライマーを用いて PCR を行う。得られた PCR 産物を制限酵素で処理し、断片長パターンの違いによりマアジとニシマアジの魚種を判別する。ミトコンドリア DNA（チトクロム b、ND5、D ループ、12S リボゾーム RNA（rRNA）、16S rRNA などを含む）は核内 DNA よりも進化速度が速い。さらにミトコンドリア DNA 内においては、非コード領域の中の D ループはチトクロム b、12S rRNA、16S rRNA などより進化速度が速い特徴がある。そのため，種の同定や系統樹解析にミトコンドリア DNA が用いられることが多い。

具体的には、抽出した DNA を用い、Lt1-ND5 及び Ht1-ND5 プライマー対を用いた PCR 産物を制限酵素 *Hin*f Ｉ及び *Eco*R Ｉでそれぞれで処理し、断片長パターンの違いにより判別する。これにより判別できない場合は、PCR 増幅産物の DNA 配列を直接解析し，各魚種に特有な配列を確認することで判別する。

２　出典

DNA の抽出は、QIAGEN 社 DNeasy Blood & Tissue kit 及び DNeasy 96 Blood & Tissue kit の製品プロトコルによる。

RFLP は、参考文献（１）を参考に行った。

３　適用範囲

マアジ属魚類のうちマアジ及びニシマアジに適用する。

４　装置

４．１　DNA 抽出

遠心機： 1.5mL 及び 2.0mL のマイクロチューブを 12,000 × g で遠心可能なもの。

マイクロピペット：0.5 ～ 1,000 μ L を分注可能な組み合わせ
例）0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ L 容等を用いる。

55 ℃及び 70 ℃で保温可能なインキュベーター

試験管ミキサー

４．２　PCR

PCR 増幅装置：GeneAmp PCR System 9700（Applied biosystems 社）又は、同等品。

マイクロピペット：0.5 ～ 1,000 μ L を分注可能な組み合わせ
例）0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ L 容等を用いる。

遠心機： 0.2 mL 及び 1.5mL のマイクロチューブを遠心可能なもの。

ゲル電気泳動装置一式：「JAS 分析試験ハンドブック　遺伝子組換え食品・検査分析マニュアル」（以降、JAS ハンドブックと記載する）基本操作編の「４　PCR 増幅及びゲル電気泳動」を参照する（注１）。

４．３　制限酵素処理

マイクロピペット：0.5 ～ 1,000 μ L を分注可能な組み合わせ
例）0.5-10 μ L、10-100 μ L、100-1,000 μ L 容等を用いる。

遠心機： 0.5 mL のマイクロチューブを遠心可能なもの。
インキュベーター：37 ℃で保温可能なもの。
ゲル電気泳動装置一式：「４．２　PCR」に同じ

５．　試薬

５．１　DNA 抽出

DNeasy Blood & Tissue Kit 又は、DNeasy 96 Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）
RNase A (100 mg/mL)
エタノール（特級）

５．２　PCR

DNA ポリメラーゼ：AmpliTaq^{TM} Gold (Applied Biosystems 社)又は、同等品。
デオキシヌクレオシド三リン酸溶液：dNTP (2 mmol/L each) AmpliTaq^{TM} Gold 添付品。
塩化マグネシウム溶液：$MgCl_2$ (25 mmol/L)　AmpliTaq^{TM} Gold 添付品。
PCR 用緩衝液：10 x　PCR buffer II AmpliTaq^{TM} Gold 添付品。
プライマー：表１「プライマー対」に従い、合成したものを購入する。
標準 DNA 溶液：
　魚種の履歴の確かなマアジ及びニシマアジから「６．１　DNeasy Blood & Tissue kit（QIAGEN 社)を用いた DNA の抽出」に従い抽出した DNA 溶液を用いる。ただし、使用する前にプライマー対 Lt1-ND5 及び Ht1-ND5 間の塩基配列をシークエンスし、図「マアジ及びニシマアジにおけるプライマー Lt1-ND5 と Ht1-ND5 間の塩基配列」と比較して魚種を確認すること（注２）。
ゲル電気泳動用試薬：「JAS ハンドブック」基本操作編の「４　PCR 増幅及びゲル電気泳動」を参照する。

５．３　制限酵素処理

制限酵素：*Hin*f I、*Eco*R I（TOYOBO 社）又は、同等品。
制限酵素用緩衝液：H Buffer 制限酵素添付品又は、同等品。
ゲル電気泳動用試薬：「５．２　PCR」に同じ

６　操作

６．１　DNeasy Blood & Tissue kit（QIAGEN 社）を用いた DNA の抽出

（１）抽出は、買い上げた１点の試料につき１点とする。すなわち買い上げ点数だけ抽出が行われる。滅菌済みのピンセット及びメス等を用いて、コンタミネーションを防止するために，表面を避け、内部の筋肉組織を採取し、抽出に供する。1.5 mL 容チューブに約 25 mg 採取する。
（２）採取した試料に、100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて 180 μＬ の Buffer ATL 及び、10-100 μＬ容のマイクロピペットを用いて 20 μＬの Proteinase K (Kit 添付品)を添加後、試験管ミキサーを用いて最高速で15秒撹拌する。
（３）試料の入ったチューブをインキュベーターを用いて 55 ℃に保温し，試料が完全に溶解するまで 2 時間以上放置する。その際，３０分毎に攪拌する。
（４）0.5-10 μＬ容のマイクロピペットを用いて 100 mg / mL の RNase A を 4.0 μＬ添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で15秒撹拌後、室温で 2 分間静置する。
（５）試験管ミキサーを用いて 15 秒間最高速で攪拌後、100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて 200 μＬの Buffer AL を添加する。
（６）試験管ミキサーを用いて最高速で15秒撹拌後、インキュベーターを用いて 70 ℃で10分間加熱

する。
（７）100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて 200 μＬのエタノールを添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で撹拌する。
（８）100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて、溶液全量を DNeasy mini column に負荷する。
（９）カラムを 6,000 × g で室温で、1 分間遠心し、カラムを新しい 2 mL チューブに移す。溶出液はチューブとともに捨てる。
（１０）100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて、Buffer AW1（注３）を 500 μＬ加え、6,000 × g で、室温で 1 分間遠心し、カラムを新しい 2 mL チューブに移す。溶出液はチューブとともに捨てる。
（１１）100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて、Buffer AW2（注３）を 500 μＬ加え、12,000 × g で室温で 3 分間遠心し、カラムを新しい 2 mL チューブに移す。溶出液はチューブとともに捨てる。
（１２）100-1,000 μＬ容のマイクロピペットを用いて、滅菌水を 200 μＬ加え、室温で1分間静置後、6,000 × g で、室温で 1 分間遠心し、DNA を溶出する。
（１３）（１２）の操作をもう 1 度繰り返し、１回目の溶出液と合わせて DNA 溶液とし、そのまま PCR の鋳型 DNA として使用する。使用するまで-20 ℃以下で保存すること。

６．２　DNeasy 96 Tissue Kit（QIAGEN 社）を用いた DNA の抽出
（１）買い上げた１点の試料につき１点とする。すなわち買い上げ点数だけ抽出が行われる。滅菌済みのピンセット及びメス等を用いて、コンタミネーションを防止するために、表面を避け、内部の筋肉組織を採取し、抽出に供する。キット添付の Collection micro tube に各試料を約 25 mg ずつ採取する。
（２）Proteinase K/Buffer ATL working solution を調製する。１抽出あたり、20 μＬの proteinase K（Kit 添付品）と 180 μＬの Buffer ATL を試験管ミキサーを用いて混合することにより調製する。この液量に抽出本数をかけた液量以上を調製すること。調製後はすみやかに次の（３）の処理を行うこと。
（３）採取した試料に、100-1,000 μＬ容の 8 連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて 200 μＬの Proteinase K/Buffer ATL working solution を添加し、Collection microtube cap（Kit 添付品）を用いて Collection microtube にふたをする（注４）。
（４）Collection microtube を立てたラックの上下を転倒させることにより、溶液と試料を混和する。
（５）ラックを遠心機を用いて室温で 3,000 × g に達するまで遠心し、スピンダウンする。
（６）試料の入った Collection microtube のラックをインキュベーターを用いて 55 ℃に保温し，試料が完全に溶解するまで 2 時間以上放置する（注５）。その際、３０分毎にラックを転倒混和し（注４）、遠心機を用いて室温で 3,000 × g に達するまで遠心し、スピンダウンする。又は、55 ℃に加温し、オーバーナイトで試料を完全に溶解してもよい。その際、３０分毎の転倒混和は省略できる。
（７）（６）の操作が終了したら、試料の入った Collection microtube のラックを 15 秒間上下に激しく振とうする（注４）。
（８）ラックを遠心機を用いて室温で 3,000 × g に達するまで遠心し、スピンダウンする。
（９）Collection microtube のふたを開け、0.5-10 μＬ容の 8 連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて 100 mg / mL の RNase A を 4.0 μＬずつ添加する。
（１０）新しい Collection microtube cap で Collection microtube にふたをし、ラックを 15 秒間上下に激しく振とう（注４）したのち、室温で 2 分間静置する。
（１１）ラックを遠心機を用いて室温で 3,000 × g に達するまで遠心し、スピンダウンする。

（１２）Collection　microtube のふたを開け、100-1,000　μＬ容の８連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて Buffer AL/E（注３）を 410 μＬずつ添加する。
（１３）新しい Collection microtube cap で Collection microtube にふたをし、ラックを 15 秒間上下に激しく振とうする（注４）。
（１４）ラックを遠心機を用いて室温で 3,000 × g に達するまで遠心し、スピンダウンする（注６）。
（１５）DNeasy 96 Plate を S-Block 上にセットする。
（１６）Collection　microtube のふたを開け、チューブ内の溶液を 100-1,000　μＬ容の８連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて 500 μＬずつ DNeasy 96 Plate の各ウェルに移す。
（１７）AirPore Tape Sheet（キット添付）を用いて DNeasy 96 Plate にシールをする。
（１８）DNeasy 96 Plate を遠心機を用いて室温で 5,635 × g で 10 分間遠心する。
（１９）AirPore Tape Sheet を取り除き、100-1,000 μＬ容の８連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて Buffer AW1（注３）を 500 μＬずつ各ウェルに加える。
（２０）新しい AirPore Tape Sheet（キット添付）を用いて DNeasy 96 Plate にシールをする。
（２１）DNeasy 96 Plate を遠心機を用いて室温で 5,635 × g で 5 分間遠心する。
（２２）AirPore Tape Sheet を取り除き、100-1,000 μＬ容の８連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて Buffer AW2（注３）を 500 μＬずつ各ウェルに加える。
（２３）新しい AirPore Tape Sheet（キット添付品）を用いて DNeasy 96 Plate にシールをする。
（２４）DNeasy 96 Plate を遠心機を用いて室温で 5,635 × g で 5 分間遠心する。
（２５）AirPore Tape Sheet を取り除き、DNeasy 96 Plate を Elution Microtube RS のラック上に移し、インキュベーターを用いて 70 ℃で 15 分間静置する（注７）。
（２６）100-1,000　μＬ容の８連（又は 12 連）マイクロピペットを用いて、あらかじめ 70 ℃に温めておいた滅菌水を各ウェルに 100 μＬずつ加える。
（２７）新しい AirPore Tape Sheet（キット添付品）を用いて DNeasy 96 Plate にシールをする。
（２８）室温で 1 分間静置後、遠心機を用いて室温で 5,635 ×　g で 1 分間遠心し DNA を溶出させる。
（２９）AirPore Tape Sheet を取り除く。
（３０）（２６）～（２９）の操作をもう 1 度繰り返し、１回目の溶出液と合わせて DNA 溶液とし、そのまま PCR の鋳型 DNA として使用する。DNA 溶液は使用するまで冷蔵あるいは冷凍で保存すること。

６．２　PCR 操作

準備

使用するチューブ、チップは使い捨てとし、使用する間近に 121 ℃、15 分以上オートクレーブ滅菌をしておくこと。

操作に当たっては、専用のパウダーフリーゴム手袋を着用すること。

操作は氷上で行う。

（1）必要な PCR チューブの本数

抽出 DNA 溶液１点につき１本ずつ PCR を行う。さらに、PCR のポジティブコントロール及び次に行う制限酵素処理のために、標準 DNA 溶液（マアジ及びニシマアジ）をそれぞれ鋳型として用いて PCR を行う。その他、DNA を含まないネガティブコントロールと、プライマーを含まないネガティブコントロールを１本用意する。なお、プライマーを含まないネガティブコントロールについては、標準 DNA 溶液（マアジ）を鋳型として用いること。参考として、必要な PCR チューブの本数を表２に示す。

（２）PCR マスターミックスの調製

PCR を行う試料数にあわせて、滅菌した 0.2　mL チューブを用意する。この本数にあわせ、表３「PCR 溶液の組成」の液量と比較して適当な倍率になるように全体の液量を決め（注８）、鋳型DNA を除く各液を混合調製したものを PCR マスターミックスとする（注９）。調製した PCR マスターミックスを用意した 0.2 mL チューブに 45 μＬずつ分注する。

プライマー対なしのネガティブコントロールについては、別にプライマー対を含まない PCR マスターミックスを用意する。なお、分注器の最小容量に注意すること。

（３）試料の添加

分注した PCR マスターミックスに試料から抽出した DNA 溶液 5 μＬを加える。DNA を含まないネガティブコントロールに滅菌水 5 μL、プライマーを含まないネガティブコントロールに標準DNA 溶液（マアジ）を 5　μL、ポジティブコントロールに標準 DNA 溶液（マアジ及びニシマアジ）をそれぞれ 5 μＬずつ加える。

試料の添加は、コンタミネーション防止の観点から、試料から抽出した DNA 溶液、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの順に行う。

（４）PCR 増幅

試料を PCR 増幅装置にかける。PCR の温度条件は「表４ PCR の温度サイクル」に定める。PCR反応終了後は、ただちに PCR 反応液のゲル電気泳動を行った後、制限酵素処理を行う。やむをえない場合は反応液を冷蔵あるいは冷凍保存しておく。

（５）ゲル電気泳動

JAS ハンドブック 基本操作編の「４　PCR 増幅及びゲル電気泳動」を参照する。アガロースゲルの濃度は、3 %(w/v)とする。

ネガティブコントロールからバンドがみられないことを確認し、ポジティブコントロール及び全ての試料の PCR 産物から予想される長さのバンド（360bp）がみられることを確認する（注１０）。確認後は、「６．３　制限酵素処理」を行う。

６．３　制限酵素処理

（１）必要な制限酵素処理用チューブの本数

制限酵素処理は、アジ試料から抽出した DNA を鋳型にした PCR 反応液１本につき１本ずつ行う。さらに、標準 DNA 溶液（マアジ及びニシマアジ）をそれぞれ鋳型とした PCR 反応液においても、制限酵素処理を行う。その他、制限酵素を入れていないネガティブコントロールとして、別に制限酵素を含まない制限酵素処理用マスターミックスを１本用意する。参考として、必要な制限酵素処理用チューブの本数を表５に示す。

（２）制限酵素処理用マスターミックスの調製

「２．６．２　PCR 操作」での PCR 産物を *Hin*f Ｉ及び *Eco*R Ｉでそれぞれ処理する。制限酵素処理を行う試料数にあわせて、滅菌した 0.2　mL のチューブを用意する。この本数にあわせ、表６「制限酵素処理の反応液組成」の液量と比較して適当な倍率になるように全体の液量を決め（注８）、PCR 反応液を除く各液を混合調製したものを制限酵素処理用マスターミックスとする。調製した制限酵素処理用マスターミックスを用意した 0.2 mL のチューブに 10 μＬずつ分注する。

制限酵素を加えていないコントロールとして、制限酵素処理の代わりに滅菌水に加え、制限酵素を含まない溶液を用意する。なお、分注器の最小容量に注意すること。

（３）PCR 反応液の添加

分注した制限酵素処理用マスターミックスに PCR 反応液 10 μＬを加える（注１１）。すべての溶液を加えたら、チューブを指ではじき攪拌した後、遠心機でスピンダウンする。制限酵素を加えていないコントロールには、標準 DNA 溶液（マアジ）を鋳型にした PCR 反応液 10 μＬを加える。

（４）制限酵素処理

Hinf　I 及び *Eco*R I 制限酵素反応液を 37 ℃で 1 時間静置する。制限酵素処理後は、ただちに反応液のゲル電気泳動を行う。やむをえない場合は冷蔵あるいは冷凍保存しておく。

（５）ゲル電気泳動

JAS ハンドブック 基本操作編の「４　PCR 増幅及びゲル電気泳動」を参照する。アガロースゲルの濃度は、3 %(w/v)とする。

Hinf I 及び *Eco*R I のそれぞれの制限酵素処理溶液について、ネガティブコントロール及びポジティブコントロール（マアジ及びニシマアジ）と共に試料の制限酵素処理溶液を電気泳動する。ゲルを可視化し、ネガティブコントロールが制限酵素により切断されていないことを確認する。また、ポジティブコントロールから表７「制限酵素処理後の RFLP パターン」と同一の RFLP パターンがみられることを確認する（注１２）。確認後は「７　魚種の判別」を行う。

７　魚種の判別

RFLP のバンドパターンが、表７「制限酵素処理後の RFLP パターン」中のマアジ及びニシマアジと合致した場合、魚種の判別ができたとする。該当するパターンが存在しない場合は、プライマー Lt1-ND5 と Ht1-ND5 の増幅産物を用いて DNA シークエンスを行う（注１３）マアジ及びニシマアジの ND5 の部分配列を図「マアジ及びニシマアジにおけるプライマー Lt1-ND5 及び Ht1-ND5 間の塩基配列」として示す。各魚種に特異的に保存されている DNA 配列と比較して、両魚種を判別する（注１４）（注１５）。

８　判別の確かさに関する情報

後述の１０　参考文献の１）によると、マアジ試料 37 件及びニシマアジ 15 件（表８「分析試料内訳」参照）について本分析法により魚種を判別したところ、マアジ試料 35 件及びニシマアジ試料 14 件について正しく判別された。マアジ試料 2 件及びニシマアジ試料 1 件については、それぞれの魚種と異なる RFLP パターンとなったため、プライマー Lt1-ND5 と Ht1-ND5 の増幅産物を用いて DNA シークエンスを行い、各魚種に特異的に保存されている DNA 配列と比較したところ、魚種を正しく判別できた。なお、RFLP パターンが異なった理由は、それぞれの制限酵素サイトに変異がみられ制限酵素による消化が行われていなかったためであった。

９　記録

PCR に供する DNA 溶液を得るために特別に行った操作があれば詳細に記録すること。

PCR産物の電気泳動結果及び制限酵素処理後の溶液の泳動結果を、画像データとして保存しておく。判別したマアジ属の魚種名を記録する。

１０　参考文献

１）Yasuharu T., Takami M., Michiaki Y.: Complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and molecular identification of two commercilly important species *T. trachurus* and *T. japonicus* using PCR-RFLP, Fisheries Science2006; **72**: 1054-1065

（注１）コンタミネーションを防止するため、電気泳動に使用するマイクロピペットは、その他の操作をするピペットと分けて管理する。

（注２）シークエンスにより魚種を確認したマアジ及びニシマアジのプライマー対 Lt1-ND5 及び Ht1-ND5 間の PCR 増幅産物をプラスミドにそれぞれ導入したものを標準 DNA 溶液として用いてもよい。

（注３）使用前にキット添付の取扱説明書に従い、エタノールを添加し調製する。
（注４）キャップが開きやすいので、キャップが十分閉まっていることを確認すること。
（注５）加温中はチューブ内の膨張によりキャップが開きやすいので、重し等を載せてキャップが浮かないようにすること。
（注６）長時間遠心しないこと。
（注７）この操作により DNeasy 96 Plate の membrane を乾燥させる。
（注８）チップの壁に反応液が付着するなどして損失する溶液量を考慮し、多めに作製する。
（注９）コンタミネーション防止の観点から PCR マスターミックスの調製はプライマーを最後に混合すること。
（注１０）ネガティブ及びポジティブコントロールに、異常が見られる場合、コンタミネーションや試薬の劣化が考えられる。JAS ハンドブック コンタミネーション防止編等を参照し、速やかに適当な処置を行った後、必要に応じて PCR をやり直すこと。
（注１１）制限酵素処理の際には PCR 反応液からの持ち越しの塩を除くことなく制限酵素処理を行っているが、本マニュアルに記載してある制限酵素処理条件で完全に消化される。
（注１２）ネガティブ及びポジティブコントロールに、異常が見られる場合、コンタミネーションや試薬の劣化が考えられる。JAS ハンドブック コンタミネーション防止編等を参照し、速やかに適当な処置を行った後、必要に応じて PCR をやり直し、制限酵素処理を行うこと。
（注１３）PCR 増幅産物が得られないなどの諸事情により、シークエンスが行えない場合は、「魚種判別不能」とする。
（注１４）シークエンス結果がどの魚種とも明らかに相同性が低い場合は、必要に応じて再度 DNA の抽出、PCR 操作を行い、シークエンスを行う。それでも魚種の特定ができない場合は、「魚種判別不能」とする。
（注１５）同じ魚種内であっても集団により配列が異なる場合がある。各魚種特異的に保存されている配列を確認し、判別する。
ネガティブ及びポジティブコントロールに、異常が見られる場合、コンタミネーションや試薬の劣化が考えられる。JAS ハンドブック コンタミネーション防止編等を参照し、速やかに適当な処置を行った後、必要に応じて PCR をやり直し、制限酵素処理を行うこと。

表１　プライマー対

対象遺伝子	記号	増幅長	配　列（5'→ 3'）	増幅部分
ミトコンドリア DNA ND5 領域	Lt1-ND5 Ht1-ND5	360 bp	CACTAACCTTTGATGTCAACAT TTGCTATTCATGCTATGGCGA	NADH dehydrogenase subunits 5 （ND5）の部分配列

表２　必要な PCR チューブの本数

	PCR の鋳型 DNA	本数
試料	抽出 DNA 溶液	X
ポジティブコントロール	標準 DNA 溶液（マアジ）	1
	〃　　（ニシマアジ）	1
ネガティブコントロール (DNA を含まない)	滅菌水	1
ネガティブコントロール (プライマーを含まない)	標準 DNA 溶液（マアジ）	1
計		X + 4

表３　PCR 溶液の組成

	液量/ tube	終濃度
滅菌水	30.75 μL	
AmpliTaq™ Gold (5 U/μL)	0.25 μL	1.25 U/ tube
10x PCR buffer II	5 μL	1 x
dNTP (2 mmol/L each)	5 μL	200 μmol/L each
$MgCl_2$ (25 mmol/L)	3 μL	1.5 mmol/L
5' プライマー (50 μmol/L)	0.5 μL	0.5 μmol/L
3' プライマー (50 μmol/L)	0.5 μL	0.5 μmol/L
鋳型 DNA	5 μL	
全量	50 μL	

表４　PCR の温度サイクル

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	95 ℃	10 min	1
変性	94 ℃	1min	35
アニーリング	55 ℃	1min	
伸長反応	72 ℃	1min	
最後の伸長反応	72 ℃	7 min	1
保存	4 ℃	-	-

表５　必要な制限酵素処理用チューブの本数

	添加する PCR 反応液	本数	
		Hinf I 処理	*Eco*R I 処理
試料	試料から抽出した DNA を鋳型としたもの	X	X
ポジティブコントロール	標準 DNA 溶液（マアジ）を鋳型としたもの	1	1
	標準 DNA 溶液（ニシマアジ）を鋳型としたもの	1	1
ネガティブコントロール (制限酵素を含まない)	標準 DNA 溶液（マアジ）を鋳型としたもの	1	1
計		X＋3	X＋3

表６　制限酵素処理の反応液組成

表６．１　*Hinf* I 処理の反応液組成

	液量/ tube	終濃度
滅菌水	7.79 μL	
Hinf I (12 U / μL)	0.21 μL	2.5 U/ tube
10x H buffe r	2 μL	1 x
PCR 反応液	10 μL	
全量	20 μL	

表６．２　*Eco*R I 処理の反応液組成

	液量/ tube	終濃度
滅菌水	7.69 μL	
*Eco*R I (8 U/ μL)	0.31 μL	2.5 U/ tube
10x H buffer	2 μL	1 x
PCR 反応液	10 μL	
全量	20 μL	

表７　制限酵素処理後の RFLP パターン

制限酵素１ / 制限酵素２		*Hinf* I	
		232 bp 84 bp 44 bp	360 bp
*Eco*R I	267 bp 93 bp		マアジ （*Trachurus japonicus*）
	360 bp	ニシマアジ （*Trachurus trachurus*）	

表８　分析試料内訳

魚種	生鮮品又は加工品の別	採取地又は原料原産地表示	試料数
マアジ	生鮮品	神奈川県小田原港付近	3
		神奈川県三浦港付近	3
		長崎県	１５
		宮崎県	3
		三重県	3
		富山県	5
	加工品	国産	5
ニシマアジ	生鮮品	アイルランド産	5
		ノルウェー産	5
	加工品（塩干品）	オランダ産	5

```
Lt1-ND5                         10                  20                  30                  40
マアジ       C A C T A A C C T T T G A T G T C A A C A T C A G C C T A A A A T T C G A C C A  40
ニシマアジ   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  40

                                50                  60                  70                  80
マアジ       C T A C T C T A T C A T C T T C A C C C C C A T C G C C C T C T A C G T C A C A  80
ニシマアジ   . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  80

                                90   EcoR I        100                 110                 120
マアジ       T G R T C C A T T C T C G A A T T C G C A T C A T G R T A C A T G C A C G C A G  120
ニシマアジ   . . A . . . . . . . . G . . G . . . . . . . . . . . A . . . . . . . . . . . . .  120

                               130                 140                 150                 160
マアジ       A C C C A T A T A T A A A C C G C T T C T T C A A A T A C C T C C T T A T C T T  160
ニシマアジ   . . . . . . . C . . G . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  160

                               170                 180                 190                 200
マアジ       C C T C A T T G C C A T G A T T A T T C T A G T C A C T G C A A A C A A C A T G  200
ニシマアジ   . . . . . . . . . . . . . . . C . . . . . . . . . . . C . . . . . . . . . . . .  200

                               210                 220                 230  Hinf I        240
マアジ       T T C C A A A T T T T T A T Y G G A T G A G A A G G C G T A G G A A T T A T A T  240
ニシマアジ   . . . . . . . . . . . C . . T . . G . . . . . G . . . . . . . . . . . C . . . .  240

                               250                 260                 270                 280
マアジ       C T T T C C T Y C T A A T T G G C T G A T G A T A C G G C C G A A C A G A T G C  280
ニシマアジ   . . . . . . . C . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . G . . . . Y . .  280

                               290                 300                 310        Hinf I   320
マアジ       C A A C A C C G C C G C C C T A C A A G C A G T T C T C T A C A A C C G G G T C  320
ニシマアジ   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . T . . A . . .  320

                               330                 340                 350        Ht1-ND5  360
マアジ       G G T G A C A T C G G A C T A A T T T T C G C C A T A G C A T G A A T A G C A A  360
ニシマアジ   . . . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  360
```

図　マアジ及びニシマアジにおけるプライマー Lt1-ND5 とプライマー Ht1-ND5 間の塩基配列
ニシマアジはマアジと異なる塩基配列のみを示してある。四角で囲んである領域は制限酵素認識部位、矢印はプライマー部位である。R=A/G; Y=C/T

別表１　加工食品品質表示基準別表２

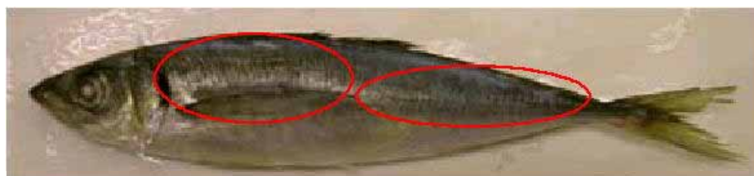
分類番号	区分
1	乾燥きのこ類、乾燥野菜及び乾燥果実（フレーク状又は粉末状にしたものを除く）
2	塩蔵したきのこ類、塩蔵野菜及び塩蔵果実（農産物漬物品質表示基準（平成１２年１２月２８日農林水産省告示第1747号）第２条に基づく農産物漬物を除く）
3	ゆで、又は蒸したきのこ類、野菜及び豆類並びにあん（缶詰、瓶詰及びレトルトパウチ食品に該当するものを除く）
4	異種混合したカット野菜、異種混合したカット果実、その他野菜、果実及びきのこ類を異種混合したもの（切断せずに詰め合わせたものを除く）
5	緑茶及び緑茶飲料
6	もち
7	いりさや落花生、いり落花生、あげ落花生及びいり豆類
8	こんにゃく
9	調味した食肉（加熱調理したもの及び調理冷凍食品に該当するものを除く）9.
10	ゆで、又は蒸した食肉及び食用鳥卵（缶詰、瓶詰及びレトルトパウチ食品に該当するものを除く）
11	表面をあぶった食肉
12	フライ種として衣をつけた食肉（加熱調理したもの及び調理冷凍食品に該当するものを除く）
13	合挽肉その他異種混同した食肉（肉塊又は挽肉を容器に詰め、成形したものを含む）
14	煮干魚介類、塩干魚介類、煮干魚介類及びこんぶ、干のり、焼きのりその他干した海藻類（細切若しくは細刻したもの又は粉末状にしたものを除く）
15	塩蔵魚介類及び塩蔵海藻類
16	調味した魚介類及び海藻類（加熱調理したものお呼び調理冷凍食品に該当するもの並びに缶詰、瓶詰及びレトルトパウチ食品に該当するものを除く）
17	ゆで、又は蒸した魚介類及び海藻類（缶詰、瓶詰及びレトルトパウチ食品に該当するものを除く）
18	表面をあぶった魚介類
19	フライ種として衣をつけた魚介類（加熱調理したもの及び調理冷凍食品に該当するものは除く）
20	4又は13に掲げるもののほか、生鮮食品を異種混合したもの（切断せずに詰め合わせたものを除く）

別表２　アジ類の国別輸入量（2003 年貿易統計より）

国名	輸入量(t)	割合（%）
オランダ	13,231	30.7%
アイルランド	8,005	18.6%
ノルウェー	7,863	18.3%
イギリス	745	1.7%
ドイツ	341	0.8%
スペイン	90	0.2%
フランス	74	0.2%
アイスランド	60	0.1%
ヨーロッパ諸国合計	30,409	70.6%
ニュージーランド	4,124	9.6%
台湾	3,334	7.7%
韓国	3,117	7.2%
中国	1,299	3.0%
ベトナム	673	1.6%
インドネシア	59	0.1%
フィリピン	52	0.1%
ヨーロッパ以外合計	12,658	29.4%
合計	43,065	100.0%



別図１　マアジ及びニシマアジ加工品の比較
マアジ（左）とニシマアジ（右）の干物。ニシマアジはマアジに比べて頭部が大きい、体高が低いなどの形態的特徴があるが、外観は非常に類似している。



上段：マアジ



中段：マルアジ



下段：オアカムロ

別図２　マアジ属及びムロアジ属の比較
マアジ属（マアジ、三重県産、図の上段）は稜鱗（ゼイゴ、赤い楕円の部分）が測線の全域を覆うが、ムロアジ属（マルアジ、宮崎県産、図の中段　及び　オアカムロ、宮崎県産、図の下段）は稜鱗が測線を部分的に覆う。